



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Nutrición**

**Efecto neuroprotector de la cáscara deshidratada de  
*Vitis vinífera* “uva borgoña” en ratas inducidas a  
toxicidad por administración de etanol**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición**

**AUTOR**

**Corazón Myrian ALIAGA FALCÓN**

**ASESOR**

**Mg. Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ**

**Lima, Perú**

**2018**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

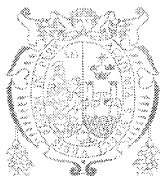
Aliaga C. Efecto neuroprotector de la cáscara deshidratada de Vitis vinífera “uva borgoña” en ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición; 2018.

---

## Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	“__”
DNI o pasaporte del autor	71940637
Código ORCID del asesor	0000-0002-6224-9165
DNI o pasaporte del asesor	10454580
Grupo de investigación	“__”
Agencia financiadora	
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Perú- Lima – Lima – Cercado de Lima  12°03'28.5"S 77°01'22.6"W
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2 años
Disciplinas OCDE	Nutrición, Dietética <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.04">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.04</a>

Nota: tomar en cuenta la forma de llenado según las precisiones señaladas en la web (las tablas OCDE están incluidas).  
[https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion\\_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios\\_30junio.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios_30junio.pdf)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Medicina



**Escuela Profesional de Nutrición**

"Año del Centenario del Museo de Historia Natural y de la Revista

Anales de la Facultad de Medicina"

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

**ACTA N° 061 DE EXAMEN DE TITULACIÓN  
MODALIDAD DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Conforme a lo estipulado en el artículo 45° de la Ley Universitaria 30220, el Jurado de Sustentación nombrado por el Comité de Gestión y la Dirección de la Escuela Profesional de Nutrición, conformado por las siguientes Docentes:

*Presidente:* Dr. Segundo Teófilo Calderón Pinillos

*Miembros:* Mg. Marita Lozano Cueva

Mg. Luis Pavel Palomino Quispe

*Asesor:* Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Se reunió en la ciudad de Lima, el día lunes 10 de diciembre del 2018, para proceder a evaluar la **Sustentación de Tesis para Optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición** de la bachiller:

**Corazón Myrian Aliaga Falcón**

Código de Matricula N° 11010411

**Tesis: "Efecto neuroprotector de la cáscara deshidratada de *Vitis vinífera* "Uva Borgoña" en ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol"**  
(Aprobado con RD N° 01907-D-FM-2014)

La mencionada bachiller aprueba el examen de titulación, mediante la modalidad de sustentación de tesis, obteniendo la calificación de:

*Dieciocho*

(En letras)

Estando de acuerdo con la presente acta, el Jurado de Sustentación firma en señal de conformidad.

Dr. Segundo Teófilo Calderón Pinillos  
Presidente

Mg. Marita Lozano Cueva  
Miembro

Mg. Luis Pavel Palomino Quispe  
Miembro

Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez  
Asesor



## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
2.1. Hipótesis .....	11
3.1. Tipo de estudio .....	11
3.3. Muestreo .....	12
3.4. Variables .....	13
3.5. Método experimental .....	14
3.6. Determinación del índice cerebral .....	16
3.7. Determinación de marcadores de estrés oxidativo .....	16
3.8. Procedimiento para el estudio histopatológico .....	19
3.9. Análisis de datos .....	19
3.10. Consideración ética .....	20
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1. Porcentaje de IC en cerebro y cerebelo en ratas según tratamiento .....	20
4.2. Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral .....	21
4.3. Niveles de grupos sulfhídrilos no proteicos en tejido cerebral .....	21
4.4. Cambios Histológicos en el tejido nervioso .....	23
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>

## I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se estima un alto número de personas que padecen enfermedades neurodegenerativas, en su mayoría alzhéimer (AD) y párkinson (PD)<sup>(1)</sup>. En la actualidad estas representan la primera causa de incapacidad en el adulto y la segunda de demencia; su impacto social está en aumento debido al incremento de la edad en la población <sup>(2)</sup>.

Los siete países con mayor número de personas con enfermedades neurodegenerativas son China, Unión Europea, Estados Unidos, India, Japón, Rusia e Indonesia <sup>(3)</sup>. Se espera un crecimiento mayor en países desarrollados de Asia (89%), en Sudamérica (77%) y en Norteamérica (63%) principalmente <sup>(3)</sup>.

Los estudios de la OMS (2012), demuestran que las enfermedades neurodegenerativas suponen a nivel mundial, un 25% de la discapacidad<sup>(3)</sup>. Ambas patologías (AD y PD), escasean de tratamientos terapéuticos, ya que los medicamentos y otras técnicas médicas solo alivian o controlan temporalmente los síntomas, pero no la causa de la enfermedad <sup>(4)</sup>. Las predicciones indican que la situación no va a mejorar, ya que las proyecciones realizadas para el año 2050 auguran que la prevalencia actual se cuadruplicará <sup>(5)</sup>, Se calcula que en el mundo tres de cada diez ancianos padecen de alguna de estas patologías (AD y PD)<sup>(12)</sup>.

Las enfermedades neurodegenerativas son insidiosas, una vez instauradas, los tratamientos son sólo paliativos y no arraigan la enfermedad en sí <sup>(6)</sup>. Es muy probable suponer que estas patologías se convertirán en gran problema de salud pública que se confrontaría en el presente actual, además presenta un elevado coste sanitario, económico y social que desestabilizaría el manejo actual del sistema sanitario <sup>(6)</sup>.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por apoptosis neuronal, pérdida de conectividad o sinapsis y distrofia cerebral que según estudios se puede deber a diversos mecanismos alterados en la reducción de los radicales libres en el tejido nervioso <sup>(7)</sup>.

Los estudios científicos durante los últimos años han demostrado que, durante el proceso de envejecimiento de una persona, los nutrientes aportados en la dieta diaria repercute importantemente en las funciones neuronales, cognitivas e intelectuales, pudiendo acelerar o retrasar el envejecimiento neuronal asociado a la edad y las enfermedades que apresuran la neurodegeneración <sup>(8)</sup>. Cada vez es mayor la evidencia que sugiere que un estado de base proinflamatorio y prooxidante favorecidos por una dieta inadecuada, es compartido por el deterioro cognitivo asociado a la edad y a las diversas enfermedades neurodegenerativas <sup>(9)</sup>.

Especialmente en el caso de las patologías neurodegenerativas, aun cuando no hay estudios certeros que expliquen a ciencia cierta la etiología de la apoptosis neuronal, se ha demostrado que el daño causado por los radicales libres contribuye de forma decisiva en su desarrollo. Estos hallazgos han permitido descubrir nuevas terapias en las patologías neurodegenerativas, utilizando compuestos que minimicen o eviten el estrés oxidativo <sup>(10)</sup>. Diversos estudios han dirigido la atención a ciertos componentes antioxidantes, pudiendo ser efectivos para la disminución de los radicales libres, logrando resultados prometedores en la neuroprotección <sup>(11)</sup>.

El Alzheimer es la causa de un 50 a 70 por ciento de los casos de demencia a nivel mundial, que pueden causar pérdida de memoria, confusión y otros síntomas asociados con esta enfermedad. Se calcula que en el mundo hay 22 millones de personas que la padecen (mayormente en el sexo masculino) y que en treinta años esta cifra se duplicará <sup>(7)</sup>.

Según la Asociación de Alzheimer Internacional, esta patología puede iniciar a una temprana edad, no logrando tener terapia efectiva aún <sup>(13)</sup>. En el Perú se estima que esta enfermedad afecta al 10% de la población anciana y que esta dolencia está relacionada al 70% de todas las demencias seniles; Las estadísticas que brinda el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, el 1% de la población de 60 a 65 años padecen de Alzheimer, en los adultos mayores de 65 a 70 años es el



4% y estos porcentajes van aumentando con la edad. No existiendo vigilancia en Salud y conocimientos exactos referente a esta enfermedad <sup>(13)</sup>

En el caso del Parkinson es considerada la segunda patología neurodegenerativa en mayor frecuencia solo después de la enfermedad de Alzheimer <sup>(14)</sup>. Debido al aumento de la población mayor, se calcula que la prevalencia de esta patología se duplicará en los países con mayor población, durante los próximos 25 años <sup>(15)</sup>.

Se han desarrollado diversos estudios en materia prospectiva, durante estos últimos años, teniendo como objetivo, mejorar el conocimiento sobre esta patología, aunque los datos epidemiológicos no son precisos, debido a la variabilidad y heterogeneidad en los resultados <sup>(21)</sup>. Los datos más cercanos estiman que la tasa de prevalencia de la enfermedad del Parkinson oscilan entre 18 y 418 por 100 000 habitantes, siendo de entre 102 y 190 por 100 000 habitantes en países occidentales <sup>(14)</sup>.

Se estima que a nivel mundial el Parkinson afecta al 1 a 2% de la población mayor de 60 años. Los casos de prevalencia son de 45 a 21 casos nuevos por 100 000 persona, siendo de entre 102 y 190 por 100 000 habitantes en países occidentales <sup>(14)</sup>. Esta dolencia afecta más en Europa, Norteamérica, Asia y África. En el Perú la epidemiología de la enfermedad se desconoce, pero se estima una incidencia de 2000 nuevos casos por año y una prevalencia de 20.000 pacientes con la enfermedad <sup>(14)</sup>.

El sistema nervioso central, está conformado por dos componentes: el cerebro y la médula espinal, albergando millones de neuronas rodeadas de células gliales <sup>(15)</sup>. Las neuronas es la unidad funcional del sistema nervioso. Las cuales cumplen diversas funciones como: Transporte axonal, Biosíntesis proteica, sinapsis, formación y mantenimiento de mielina, etc. <sup>(17)</sup>.

El cerebro tiene una alta demanda metabólica, que consume alrededor del 20% del oxígeno, siendo un órgano que no ocupa más del 2% del peso del cuerpo. El cerebro tiene dos hemisferios, izquierdo y derecho, que se encuentran separados

por una fisura, pero se encuentran unidos por el cuerpo caloso, que es un conjunto de fibras nerviosas de un tamaño de 10 cm, que permite ambos hemisferios se comuniquen <sup>(15)</sup>. El 85% del peso del cerebro corresponde a los dos hemisferios izquierdo y derecho, teniendo un desarrollo complejo, con una gran superficie, diferenciado con el de las otras especies. <sup>(15)</sup>

La principal función del sistema nervioso es controlar y regular el cuerpo humano <sup>(16)</sup>. El cerebro es un órgano que equilibra la percepción y el pensamiento, debido a las terminaciones nerviosas, puede integrar el funcionamiento de diferentes partes del cuerpo humano y vincularlas para un fin específico. El sistema nervioso tiene mayor actividad debido a las experiencias sensoriales como: visual, gustativa, auditiva, táctil, que causan un estímulo inmediato, pudiendo almacenarse en la memoria <sup>(16)</sup>.

Cuando el individuo envejece presenta alteraciones de la fosforilación oxidativa (formación de ATP llevada a cabo en la mitocondria) el cual favorece la formación de radicales libres y el incremento de los niveles de Ca libre en el citosol <sup>(18)</sup>.

Mientras avanza el proceso de envejecimiento, empiezan a haber cambios en las funciones cerebrales, disminuye la coordinación motora, hay alteraciones en las funciones mentales, se registran cambios en los patrones de sueño, hay cambios morfológicos en el cerebro, en peso y volumen; esto se debe a que la neurodegeneración debido al paso de los años, reduce la cantidad de neuronas y vasos sanguíneos, conllevando a un aumento de las neuronas atroficas. <sup>(18)</sup>. La sustancia gris disminuye a partir de los 30 años y la sustancia blanca entre la 60 y la 70 años. En el transcurso de los años, los cambios que sufre el cerebro se vuelven irremediables, estas modificaciones son físicas, bioquímicas, macroscópicas, microscópicas, etc. <sup>(18)</sup>

Cuando avanza el tiempo, la neurodegeneración en el cerebro y el sistema nervioso periférico va en aumento, hay presencia de apoptosis neuronal y una disminución del peso cerebral, la sinapsis se hace más lenta y hay presencia cúmulos de lipofucsina en el lisosoma, proteínas que forman cuerpos en forma de

hilo muy fino, conocidos como neurofibrilas, así como cuerpos amorfos llamados amiloides, junto al sistema de vasos sanguíneos que generan problemas a futuro relacionados con la neurodegeneración <sup>(19)</sup>. Estos descubrimientos se han visto en cerebros de adultos mayores sanos, así como con personas con demencia o enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson <sup>(19)</sup>.

Aún con los actuales descubrimientos, los conocimientos son limitados, el cerebro sigue siendo un órgano muy complejo, limitando el tratamiento de diversas patologías relacionados a este <sup>(15)</sup>.

Se ha demostrado que en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente Alzheimer y Parkinson, existen anomalías en el proceso de plegamiento de proteínas, anormalidades en la síntesis de nuevas proteínas, especialmente en las modificaciones post-traduccionales, y en el proceso de proteólisis, problemas en el *Splicing*, siendo anomalías en el acoplamiento en un grado genético, incorrecta expresión y reducción de las proteínas degradadas <sup>(20)</sup>.

En el cerebro las proteínas neuronales que son defectuosas, se eliminan a través de diversos mecanismos celulares, mientras avanza la neurodegeneración conforme a la edad, en diversos individuos estos procesos de eliminación se ven afectados, acumulando neurofibrilas que afectarían la función cerebral. Cuando estas proteínas empiezan a acumularse de forma descontrolada, empieza a manifestarse los primeros signos de las enfermedades neurodegenerativas <sup>(17)</sup>.

Las patologías neurodegenerativas son enfermedades progresivas y se vuelven crónicas, se caracteriza por pérdida neuronal de forma selectiva, especialmente la neuronas que regulan el sistema cognitivo, motor y sensorial. La identificación de diversos patrones de apoptosis neuronal y marcadores celulares específicos, ha ayudado a la clasificación de estas patologías, siendo de gran ayuda para direccionar los posibles tratamientos en la actualidad. Las manifestaciones de cada patología son las siguiente: Ovillos neurofibrilares, Placa seniles, apoptosis neuronal y deficiencia en acetilcolina, son rasgos que definen a la patología de

Alzheimer <sup>(18)</sup>; Aparición de cuerpos deformes, llamado “Lewy” debido al científico que los descubrió Friedrich Lewy, junto a la depleción de dopamina son características marcadas en la patología de Parkinson <sup>(18)</sup>.

Los genes irregulares que generan estas enfermedades siguen siendo muy complejos y diversos. En la enfermedad neurodegenerativa del Alzheimer, estos genes son diversos, siendo cada uno indistintos y parecidos a la vez, que con una dieta inadecuada la manifestación de estos es mucho mayor y puede presentar el manifiesto de la enfermedad <sup>(19)</sup>.

En la enfermedad del Parkinson, aun las causas que genera la apoptosis neuronal que originan esta patología no son claras, muchos estudios han encontrado toxinas y anormalidades genéticas, no siendo suficientes, limitando el tratamiento clínico en la actualidad <sup>(21)</sup>.

Con los avances científicos, se han descubierto mecanismos neurodegenerativos anormales en las neuronas dopaminérgicas. Estos conducen que una principales causas de la deficiencia en el almacenamiento de la dopamina, es la acumulación irregular de especies reactivas de oxígeno, generando estrés oxidativo, siendo un punto de partida en la causa de la apoptosis neuronal descontrolada y selectiva, lo que más adelante progresará a la enfermedad de Parkinson <sup>(21)</sup>.

El conocimiento del efecto de los diversos mecanismos fisiopatológicos desarrollados en estas enfermedades neurodegenerativas y la creación de sustancias reactivas de oxígeno, genera un punto de vista que no habíamos analizado años pasados: La prevención de las patologías neurodegenerativas están relacionadas al control y disminución del estrés oxidativo generado por los radicales libres. Encontrando nutrientes antioxidantes en la naturaleza <sup>(21)</sup>.

Uno de los metabolitos más importantes que mide el grado de protección a nivel celular es el Glutation, siendo este el mayor componente de los grupos sulfhidrilos no proteicos en el cerebro, este componente es muy estudiado en patologías

relacionadas al estrés oxidativo, ya que la disminución de este componente demostraría una inadecuada protección del organismo frente a estos compuestos reactivos. <sup>(25)</sup>

El Glutatión es un tripéptido conformado por tres aminoácidos: Cisteína, Glicina y Ácido glutámico, siendo uno de los más grandes antioxidantes, creados por el organismos. En el cerebro actúa como un neuromodulador, previniendo futuros daños debido a los radicales libres en el cerebro, ya que reduce el grupo tiol de las proteínas. <sup>(26)</sup>

Los estudios recientes, han puesto en manifiesto el importante uso de antioxidantes con fines en la salud, en especial antioxidantes naturales por no poseer efectos adversos, a diferencia de los sintéticos <sup>(29)</sup>. Gracias a ellos, las últimas investigaciones están apuntando en la búsqueda y utilización de súper alimentos con grandes compuestos antioxidantes.

Los últimos estudios abarcan a la nutrición como eje trascendental en la prevención de las diversas patologías sobre envejecimiento celular, tomando como punto de partida la existencia de diversos alimentos con alta capacidad antioxidante <sup>(30)</sup>.

Dentro de las fuentes naturales, la uva (variedad morada) constituye una opción importante en la búsqueda de súper alimentos con gran aporte de nutrientes antioxidantes. Siendo justificado de esta manera, la uva es fuente de compuestos bioactivos, encontrándose en su mayoría en la cáscara, y es fácilmente obtenible <sup>(31)</sup>. Todo sumado a la accesibilidad y biodiversidad que presenta esta fruta en el país, más aun en regiones costeras. Son, además frutos considerados no tóxicos. Su consumo como parte de la dieta se relacionado con diversos beneficios en el sistema cardiovascular, hepático y neurológico <sup>(32)</sup>.

La cáscara y semilla de la uva, así como el vino, tienen entre sus componentes apolifenoles, vitaminas C y E, flavonoides, entre otros, todos ellos con capacidad antioxidante y que sugieren protección tisular frente al estrés oxidativo <sup>(33)</sup>.

Las enfermedades crónicas metabólicas como: Diabetes Mellitus, Cardiopatías, Enfermedades respiratorias y diversas neoplasias, se han relacionado con un aumento del estrés oxidativo en el cuerpo, estos hallazgos han ampliado las investigaciones de alimentos con capacidad antioxidante, nutrientes obtenidos de la naturaleza que han demostrado disminuir los radicales libres y metabolitos oxidantes, y el grupo más mencionados, son los frutos rojos, como la uva y sus derivados <sup>(34)</sup>.

En el organismo el mecanismo de protección frente a los radicales libres se genera de forma natural, pero este proceso desencadenante está muy relacionado con la nutrición de la persona, más aun si se suma un estilo de vida saludable. Los nutrientes que aporta la uva, en especial su cáscara y semillas, han demostrado tener componentes con gran capacidad antioxidante, siendo una alternativa prometedora frente a la protección del organismo <sup>(35)</sup>.

Estas sustancias con gran capacidad antioxidante de la Uva, se han localizado en su cáscara y semillas. No obstante su pulpa, posee nutrientes como vitaminas y ácidos fenólicos <sup>(35)</sup>.

Los estudios científicos mencionan que el consumo de diversos nutrientes con propiedad nutracéutica como: Vitaminas A, C, E y D, pigmentos naturales como Carotenoides o Xantinas y diversos compuestos fenólicos, minimizan el desarrollo de diversas patologías generadas por el estrés oxidativo, manifestando que la nutrición cumple un rol importante frente a la defensa de diversas patologías generadas por el estrés oxidativo. <sup>(37)</sup>

La estructura de los compuestos fenólicos está desarrollada para eliminar radicales libres, porque posee un átomo de hidrógeno, que cambiaría la estructura de un compuesto radical. <sup>(39)</sup> Esta propiedad antioxidante de diversos polifenoles se debe a la cantidad y ubicación de los grupos hidroxilo que se encuentra en su estructura. Además los estudios actuales han demostrado las diversas acciones

en el organismo de los compuestos fenólicos, una de las más importantes, la inhibición de la agregación plaquetaria. <sup>(39)</sup>

Los grupos fenólicos de la *Vitis vinífera* se encuentran especialmente en cáscara y semillas, siendo bajo en la pulpa. <sup>(40)</sup>

La Uva está compuesta de agua, ácidos libres, sacarosa, ácido málico, tartárico y glicólico. Compuestos fenólicos como Quercitrina y quercetina. Pigmentos naturales como Hemocianina <sup>(41)</sup>.

Los avances científicos están centrándose en los beneficios de los compuestos fenólicos, sobre la acción genética, entre ello, la expresión de genes diana relacionado con la proliferación de las células, y en otras líneas de células cancerosas humanas (en particular colorrectales) <sup>(45)</sup>. Estudios apuntan al resveratrol como un principal inductor en la disminución de la apoptosis en una línea de células de neoplasia al colon <sup>(45)</sup>.

Por ello investigar sobre la uva, en este caso su cáscara por sus diversos compuestos bioactivos, y su probable capacidad de modular funciones biológicas del organismo, sería la clave de esta investigación. Siendo la nutrición como un factor clave en la prevención y el tratamiento de estas patologías podría ser el eje principal de defensa frente a la acción de los radicales libres en el cerebro que podrían ser causa de la neurodegeneración. <sup>(8)</sup> Sin embargo, a pesar de toda la evidencia muy prometedora, aun son necesarios más estudios que No obstante, aunque la evidencia al respecto es muy prometedora, son necesarios más estudios que abarquen estos enfoques.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

La cáscara deshidratada de *Vitis vinífera* presenta efecto neuroprotector en ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo General**

Determinar el efecto neuroprotector de la cáscara deshidratada de *Vitis vinífera* en ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol.

#### **2.2.2. Objetivos Específicos**

Determinar el efecto sobre los marcadores de estrés oxidativo en tejido cerebral tras la administración de cáscara deshidrata de *Vitis vinífera* en ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol.

Determinar el efecto sobre la morfología en el tejido cerebral tras la administración de cáscara deshidratada de *Vitis vinífera* en ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol.

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

**3.1. Tipo de estudio:** Según Argimon<sup>(47)</sup>; Analítico, Experimental, Longitudinal y Prospectivo.

### **3.2. Materiales**

#### **3.2.1. Material Biológico**

**Fruto:** Cáscara deshidrata de *Vitis vinífera* “uva borgoña”



**Animales:** Ratas Albinas *Rattus Norvegicus*de, machos raza Holtzman

### **3.2.2. Reactivos y fármacos**

- DTNB- Reactivo de Ellman (5,5 '-ditiobis-(2-nitrobenzoico) Sigma®
- Ácido 2-tiobarbitúrico. Sigma®
- TCA (Ácido tricloroacético). Sigma®
- EDTA (Ácido Etildiaminotetraacético). Sigma®
- Buffer fosfato 0,01 M pH 7,4
- Etanol, metanol (SPECTRUM ®)
- Halatal®. Montana.

### **3.2.3. Equipos e instrumentos**

- Balanza electrónica Radwag WTB – 200 Max. 200 g d= 0,001g
- Espectrofotómetro NV 203 – Greetmed
- Centrífuga para tubos – Greetmed Modelo GT119-300
- Homogeneizador Ultra Turrax IKA T10 Basic. Dispenser 230 V, 50/60 HZ
- Baño María AVALIER modelo VL-32
- Estufa Unic's
- Pipeteador de volumen ajustable Kacil

### **3.3. Muestreo**

El número de ratas fue elegido según juicio de expertos, de un total de 24 y se distribuyeron aleatoriamente (al azar) en tres grupos de ocho animales cada uno, dividiéndose en grupos controles y experimental, asegurando la aleatoriedad del estudio.

### 3.4. Variables

#### Variable independiente

*Cáscara deshidratada de Vitis vinífera*: Es el epicarpio de la uva, que es la parte más externa del fruto, es de una capa fina y de tipo seroso; a la cual se ha sometido un método de deshidratado que es la reducción o actividad del agua por contacto con aire caliente <sup>(49)</sup>.

#### Variable dependiente

*Efecto neuroprotector*: Empleo de cualquier modalidad terapéutica que previene, retarda o “revierte” la muerte celular resultado de una lesión neuronal <sup>(49)</sup>, disminuyendo la acción de diversos eventos de apoptosis neuronal, el aumento de radicales libres, producción de cuerpos tóxicos y liberación de neurotransmisores. <sup>(50)</sup>

#### Operacionalización de variables

Variable	Dimensiones	Indicadores	Categorías/puntos de corte	Escala de medición
Cáscara de <i>Vitis Vinífera</i>	-----	Administración de la cáscara de uva	Cáscara de uva a dosis: -1000mg/kg/día	Razón
Neuroprotección	Morfología del tejido cerebral	- Índice Cerebral	Comparados con el grupo control	Razón
		- Histología del cerebro y Cerebelo		Nominal
	Marcadores del estrés oxidativo	- GSH		Razón
		- Lipoperoxidación		Razón

### **3.5. Método experimental**

#### **3.5.1. Recolección de la muestra:**

Se utilizó cáscara de uva variedad borgoña de la especie *Vitis Vinífera L*; proveniente del valle de Cañete; cosecha del mes de Octubre, en estado madura.

Se realizó un previo lavado y se separó la cáscara del mesocarpio descartando el contenido del fruto. La cáscara se colocó sobre una fuente con papel secante, lo cual se llevó a deshidratación con una estufa de flujo de aire caliente a temperatura de 40°C x 24 horas. Se trituró a molino de cuchilla y se pasó por colador doble malla para obtener un polvo fino de la cáscara, las muestras fueron suspendidas en suero fisiológico de 1/10.

#### **3.5.2. Condicionamiento y aclimatación de los animales:**

Se emplearon 24 ratas machos de la raza Holtzman de un peso de 183g  $\pm$  7g, adquiridos del centro de crianza de la Universidad Nacional Agraria La Molina, los cuales fueron mantenidos bajo condiciones controladas en una temperatura ambiente de 22° C con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, se les administró alimentos balanceados adquiridos en el mismo centro, tanto la alimentación como el agua se proporcionaron *ad libitum*.

#### **3.5.3. Método de inducción:**

Se utilizó la técnica de daño cerebral por etanol, estudio empleado de **Witte y Bada, 1983** <sup>(51)</sup> y utilizado por **Wathita Phachonpai, 2012** <sup>(52)</sup>, en donde el etanol es administrado vía intraperitoneal a una dosis 1,8 g/kg/día.

Los animales fueron pesados y distribuidos de manera aleatoria en tres grupos (n=8) los cuales fueron alimentados con dieta balanceada y recibieron el siguiente tratamiento:

Grupo I: Se administró suero fisiológico 1mL/100g/día vía per-oral y después de 30 minutos suero fisiológico 4mL/kg/día vía intraperitoneal desde el día 1 al 14 del tratamiento.

Grupo II: Se administró suero fisiológico 1mL/100g/día vía per-oral; después de 30 minutos se le administró etanol al 40% por vía intraperitoneal en dosis de 1,8g/kg/día desde el día 1 al 14 del tratamiento.

Grupo III (Experimental): Se administró la cáscara suspendida de uva vía per-oral en dosis de 1000 mg/kg/día, después de 30 minutos se le administró etanol al 40% vía intraperitoneal en dosis de 1,8g/kg/día desde el día 1 al 14 del tratamiento.

Luego de cumplirse el tratamiento, transcurrido 12 horas, se sacrificaron a los animales previa anestesia con Pentobarbital Sódico (2mL/kg).

El cerebro y el cerebelo fueron removidos de la cavidad craneana y lavados con NaCl 0,9 %. Los dos hemisferios cerebrales fueron separados y pesados. El hemisferio izquierdo se utilizó para la determinación bioquímica de los marcadores de estrés oxidativo, siendo conservado en frío (4°C) y el hemisferio derecho y el cerebelo fueron conservados para el estudio histológico en solución tamponada de formol al 10% (NaCl 0,9%) y enviado al Instituto de Patología de la UNMSM-Sede Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

### 3.6. Determinación del índice cerebral

El índice cerebral se determina con el peso del tejido (cerebro y cerebelo) respecto al peso corporal

Para determinar el índice cerebral se aplicó la siguiente fórmula

$$\% \text{ IC} = \frac{W_t}{W_{pa}} \times 100$$

IC: Índice cerebral

Wt: Peso del tejido (cerebro o cerebelo)

Wpa: Peso del animal

### 3.7. Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Para la determinación de los marcadores estrés oxidativo se preparó los siguientes homogeneizados de cerebro:

#### Homogeneizado para la lipoperoxidación

Se pesó aproximadamente 0,65 g de tejido de cerebro y se homogeneizó a un volumen final de 2 mL con buffer fosfato 0,01 m pH 7,4.

#### Homogeneizado para GSH

Se pesó aproximadamente 0,65 g de tejido de cerebro en un volumen final de 2 mL con EDTA 0,02 mol/L.

#### 3.7.1. Determinación de los niveles de lipoperoxidación

Se empleó la técnica propuesta por Buege y Aust.<sup>(49)</sup> modificado por Suarez.<sup>(50)</sup> Mediante la reacción de dos moles de ácido 2-tiobarbitúrico con una mol de malondialdehído, este aldehído es más significativo en dicha reacción, que es producto de la lipoperoxidación de los ácidos grasos, principalmente de membranas, y que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, forma un complejo coloreado con una absorción máxima a los 535 nm, la intensidad de esta coloración será proporcional al grado de oxidación de los ácidos grasos.

### Protocolo

Para esta técnica se tomó 0,5 mL de homogenizado de cerebro y se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en un tubo con tapa, el cual fue sometido a ebullición por 10 minutos en baño María. Luego se retiró y enfrió con agua. Posteriormente se le agregó 1,5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% en HCl 0,25 N, y se llevó a baño María hirviendo por 20 minutos, se retiró y centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos, la absorbancia del sobrenadante se midió en el espectrofotómetro a 535 nm.

Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar  $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  del complejo coloreado formado por el malondialdehído-tiobarbitúrico.

Los resultados se expresaron como nmol/g de peso de tejido y porcentaje de inhibición, mediante la siguiente fórmula:

$$TBARs \text{ nmol/g} = \frac{(ABS_{MP-BI}) \times VH \times Vrx \times 10}{1,56 \times Wc \times VHRx}$$

ABS<sub>(MP-BI)</sub>: absorbancias de la muestra restado del blanco reactivo

VH: Volumen del homogenizado (2 mL)

Vrx: Volumen de la reacción (3 mL)

Wc: peso del tejido a homogenizar

VHRx: volumen del homogenizado empleado para la reacción (0,5 mL)

Los resultados también fueron expresados en % de inhibición al tratamiento

$$\% \text{ inhibición} = \frac{IGC - IMP}{IGC} \times 100$$

IGC: Índice de la media del grupo control (II)

IMP: índice de la media de la muestra del problema

### 3.7.2. Determinación de GSH

Se aplicó el método de Boyne y Ellman<sup>(53)</sup>.

**Fundamento:** La oxidación de los grupos sulfhídrilos por el ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), produce la formación de un mol de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), que fue leído a 412 nm.

**Protocolo:** Para esta técnica se tomó 1 mL del homogenizado en un tubo de centrifuga, 2 mL de ácido tricloroacético al 50% (TCA) y 0,8 mL de agua, se mezcló y se reposó por 15 minutos, luego se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos. Se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se agregó 2 mL de buffer TRIS 0,4 mol/L, pH 8,9 luego se añadió 0,025 mL de DTNB 0,01 mol/L y mezcló. Luego fue leído a 412 nm antes de los 5 minutos, y se procede a registrar las absorbancias, se expresa los resultados como ug GSH/mL/g de tejido y porcentaje de incremento, el cual fue determinado por la siguiente fórmula:

$$GS-NP \mu g/g = \frac{FC \times (ABS_{MP-BL}) \times VH \times Vrxp \times VRf}{Wc \times Vsn}$$

FC: 65,676  $\mu$ mol%

ABS<sub>(MP-BL)</sub>: absorbancias de la muestra problema restado del blanco reactivo.

VH: Volumen del homogenizado (2mL)

Vrxp: volumen de la reacción precipitante (2,2 mL)

VRf: volumen de la reacción final (2,525 mL)

Wc: peso del tejido cerebral

Vsn: volumen del sobrenadante (0,5 mL)

Los resultados también fueron expresados en % de inhibición al tratamiento

$$\% \text{ incremento} = \frac{IMP-IGC}{IGC} \times 100$$

IMP: índice de la media de la muestra problema

IGC: índice de la media del grupo control (grupo II)

### 3.8. Procedimiento para el estudio histopatológico

Al cerebro y cerebelo se le realizaron cortes histopatológicos, y estos fueron procesados en el Instituto de Patología de la UNMSM-Sede Hospital Nacional Arzobispo Loayza, leídos y analizados por el Dr. José Ernesto Raez Gonzales, médico Anatómo Patólogo. Para la lectura de las láminas se utilizó la tinción **hematoxilina eosina**.

Se evidenció en el cerebro el núcleo, nucléolo y citoplasma de las neuronas piramidales, neuroglías y en el cerebelo las células de Purkinje.

### 3.9. Análisis de datos

Después de la ejecución del diseño experimental, los datos recogidos fueron ordenados y analizados a una hoja de cálculo en MS-Excel 2010, para ser procesados luego mediante el programa estadístico SPSS 21. Primero se realizó un análisis descriptivo expresado en promedios y desviación estándar.

Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro Wilk para determinar si la distribución es simétrica o asimétrica y así aplicar análisis de varianza. Para los datos paramétricos se aplicó ANOVA y no paramétricos Kruskal Wallis. Se utilizó el valor  $p < 0,05$  y/o  $p < 0.01$  para la consideración de diferencia estadísticamente significativa.



### **3.10. Consideración ética**

En el aspecto ético, según la Ley Peruana N °27265 de la protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio, en el Título IV, de la experimentación e investigación y la docencia, se permite la experimentación para el estudio y el avance de la ciencia, cuando el mismo resulte necesario para el tratamiento de enfermedades que afecten tanto al hombre como a los animales y siempre que no se afecte la naturaleza del experimento o investigación, y se establecerán procedimientos para mitigar el sufrimiento del animal. <sup>(54)</sup>

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a los principios del cuidado y utilización de animales de laboratorio en investigación y bajo las recomendaciones de la Federación de Animales de Laboratorio (FESSACAL) <sup>(55)</sup>

## **IV. RESULTADOS**

Al utilizar la prueba de Shapiro Wilk se determinó que los indicadores empleados en este estudio presentaron una distribución normal, y se utilizó la prueba ANOVA y Post Hoc de Games - Howell ya que las muestras tuvieron varianzas diferentes.

La evaluación del efecto neuroprotector en el grupo tratado con *Vitis Vinífera* (Uva) frente al daño del tejido cerebral inducido por etanol en ratas se determinó mediante el análisis de marcadores de estrés oxidativo como GSH y TBARS en el tejido; y la morfología de este, como, el peso del tejido (cerebro y cerebelo) relacionado al peso del animal (%IC)

### **4.1. Porcentaje de IC en cerebro y cerebelo en ratas según tratamiento**

Se observa en la Tabla 2, que el porcentaje de IC en el tejido del cerebro fue mayor en el grupo que se le administró cáscara deshidratada de *Vitis*

*Vinífera* (grupo III) en un 12.5% comparado con el grupo I, y 16 % mayor con los valores del grupo II. Siendo diferentes de forma significativa el grupo I y III ( $p<0.05$ ). El grupo II obtuvo los menores valores comparado con el grupo I y III.

En IC en el tejido de cerebelo los valores fueron similares entre el grupo I y el grupo II. El grupo III su IC fue 12% mayor comparado con el resto de los grupos.

#### **4.2. Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral**

Se observó que tras la intoxicación con etanol los niveles de lipoperoxidación expresados en especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se incrementaron significativamente en el tejido cerebral (grupo II) en comparación al grupo I ( $p<0,05$ ).

Respecto a la tabla 3, el grupo III que recibió el tratamiento con cáscara deshidratada de *Vitis vnífera*, obtuvo una disminución significativa de los niveles de lipoperoxidación en comparación con el grupo II (14.31%), Siendo incluso el grupo III 6% mayor con el grupo control I.

#### **4.3. Niveles de grupos sulfhídrilos no proteicos en tejido cerebral.**

Se observó que tras la intoxicación con etanol los niveles de GS-NP se incrementaron en el tejido cerebral (grupo III) en comparación al grupo I y II, siendo significativo con el grupo II ( $p>0,05$ ).

Respecto a la tabla 4, se observa que el grupo III que recibió el tratamiento con cáscara deshidratada de *Vitis vinífera*, sus niveles de GS-NP es 14% mayor comparado con el grupo II, siendo esto significativo.

**Tabla 2.** Nivel del % de IC en cerebro y cerebelo en de ratas según tratamiento.  
(n=24)

	IC Cerebro %	IC Cerebelo %
<b>Grupo I<sup>a</sup></b>	0.55±0.04 <sup>d</sup>	0.11±0.00
<b>Grupo II<sup>b</sup></b>	0.53±0.03	0.11±0.00
<b>Grupo III<sup>c</sup></b>	0.62 ±0.02	0.12±0.01

a:Sin tratamiento. b:Tratamiento: etanol  
c:Tratamiento: etanol y cáscara de Vitis Vinífera (Uva)  
d:Media ± SD

**Tabla 3.** Lipoperoxidación en homogeneizado de cerebro de ratas según grupo de tratamiento.  
(n=24)

	Lipoperoxidación Nmol/mL/g de tejido	% de inhibición
<b>Grupo I<sup>a</sup></b>	27.30 ± 2.17 <sup>d</sup>	.....
<b>Grupo II<sup>b</sup></b>	33.73 ± 2.10	.....
<b>Grupo III<sup>c</sup></b>	28.90 ± 0.65	14.31

a:Sin tratamiento. b:Tratamiento: etanol  
c:Tratamiento: etanol y cáscara de Vitis Vinífera (Uva)  
d:Media ± SD

**Tabla 4.** Grupos sulfhídricos no proteicos (GS – NP) en homogeneizado de cerebro de ratas según grupo de tratamiento  
n=24

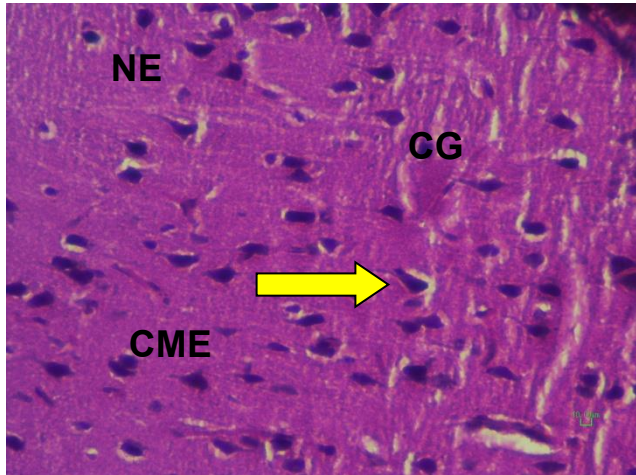
	<b>GS-NP µg/mL/g de tejido</b>	<b>% de incremento</b>
<b>Grupo I <sup>a</sup></b>	7.70 ± 0.46 <sup>d</sup>	.....
<b>Grupo II <sup>b</sup></b>	6.58 ± 0.39	.....
<b>Grupo III <sup>c</sup></b>	7.53 ± 0.29	14%

*a: Sin tratamiento. b: Tratamiento: etanol  
c: Tratamiento: etanol y cáscara de Vitis Vinífera (Uva)  
d: Media ± SD*

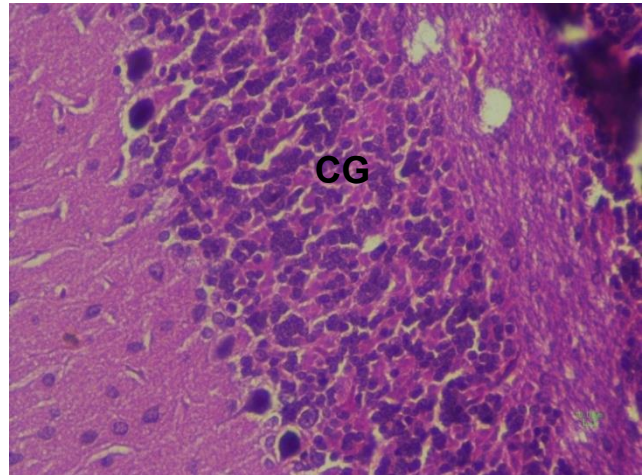
#### **4.4. Cambios Histológicos en el tejido nervioso**

La descripción Histológica de los tejidos cerebro y cerebelo de las ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol identificó la presencia de:

**GRUPO I:** En el cerebro se observó capa granulosa, la corteza cerebral y, no tuvieron alteraciones histológicas (Figura 1); y en el tejido del cerebelo, las células Purkinje se encontraron normales. (Figura 2)

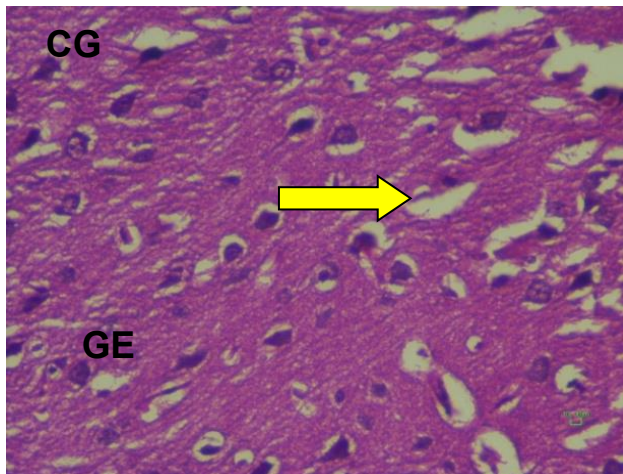


**Figura 1.** Microfotografía de la corteza cerebral del Grupo I (Sin tratamiento) se observa la capa granulosa externa, existe presencia de neuronas piramidales pequeñas (Flecha) y células granulosas (CG) normales. Tinción H-E 40 X'

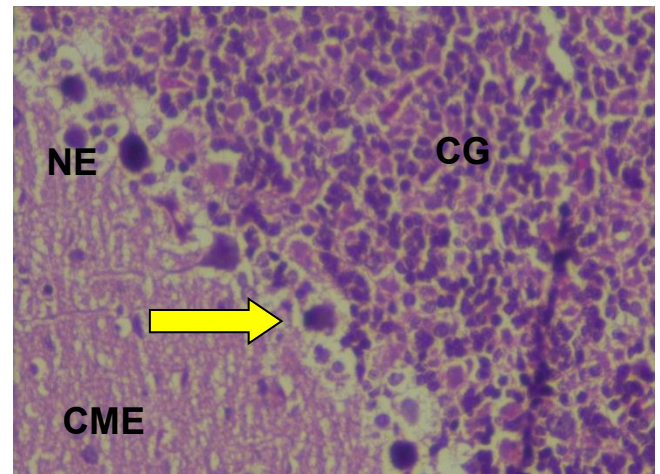


**Figura 2.** Microfotografía de la corteza cerebelo del Grupo I (Sin tratamiento) se observa la capa molecular externa (CME), capas de células de Purkinje (Flecha), capa granulosa (CG) y neuronas en cesto (NE) normales. Tinción H-E 40 X'

**GRUPO II:** En el cerebro se observó que 5/6 de las muestras evidenciaron una capa granulosa anormal (neuronas de distinto tamaño) y el 50% con una disminución agresiva de las células. En la corteza cerebral se evidencia un aumento de las microglías siendo severo en un 50% de las muestras (Figura 3). En el cerebelo, se observó una disminución de células de Purkinje y anosiotosis de forma agresiva y la presencia de edema en el 100% de las muestras. (Figura 4)

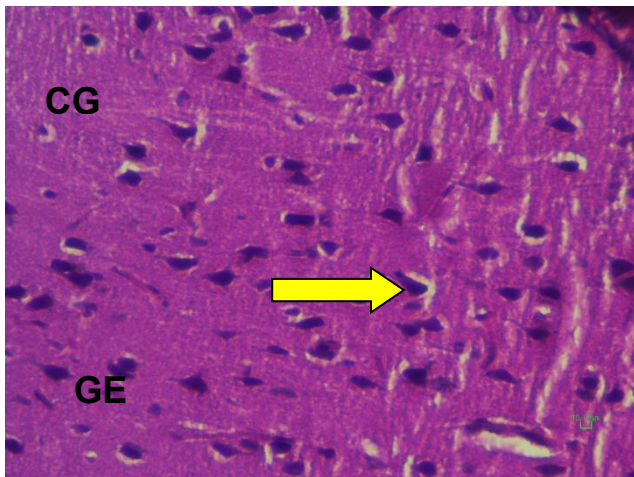


**Figura 3.** Microfotografía de la corteza cerebral del Grupo II (Tratamiento etanol), se observa la capa granulosa externa (GE) presenta un aumento de los números de macro y micro glías, existe presencia de neuronas piramidales con edema moderado (Flecha) y células granulosas (CG) normales. Tinción H-E 40 X'.

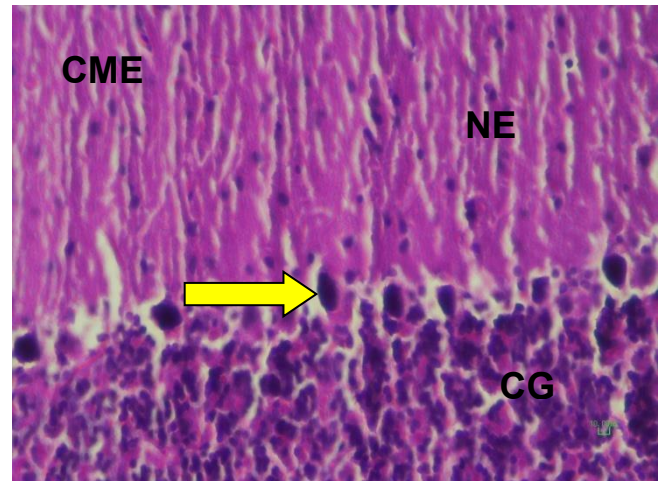


**Figura 4.** Microfotografía de la corteza cerebelo del Grupo II (Tratamiento etanol) se observa la capa molecular externa (CME), capas de células de Purkinje (Flecha), capa granulosa (CG) y neuronas en cesto (NE) de forma edematosa grave, anormales y de distintos tamaños. Tinción H-E 40 X'

**GRUPO III:** En el cerebro, (4/6) se evidenció que la capa granulosa normal. La corteza cerebral tuvo un aumento leve de las macroglías (2/6) y presencia de edema leve en (1/6) de las muestras (Figura 5). En el cerebelo (5/6) de las muestras, las células de Purkinje se encontraban normales, presentando ligero edema en (1/6) de las muestras. (Figura 6)



**Figura 5.** Microfotografía de la corteza cerebral del Grupo III (Tratamiento etanol/Tratamiento *Vitis vinifera*), se observa la capa granulosa externa (GE) presenta un ligero aumento de los números de macro y micro glías, neuronas piramidales normales (Flecha) y células granulosas (CG) normales. Tinción H-E 40 X'.



**Figura 6.** Microfotografía de la corteza cerebelo del Grupo III (Tratamiento etanol/Tratamiento *Vitis vinifera*) se observa la capa molecular externa (CME), capas de células de Purkinje (Flecha), capa granulosa (CG) y neuronas en cesto (NE) de forma normal, con ligero edema en las células de Purkinje. Tinción H-E 40 X'.

## V. DISCUSIÓN

En la actualidad se ha generado un gran interés sobre el daño producido por los radicales libres en la etiología de las enfermedades. Se ha propuesto al estrés oxidativo como uno de los causantes de las enfermedades crónicas tales como las cardiovasculares, oncológicas y neurológicas. <sup>(63)</sup>

El estudio de alimentos que poseen componentes con propiedad antioxidantes se ha incrementado en las últimas décadas debido a que la ingesta se ha relacionado como coadyuvante terapéutico en las enfermedades crónico – degenerativa; capaces de inhibir la peroxidación de lípidos en la membrana celular, asociadas a la disminución de riesgos de



padecer enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson.  
(64)

En el grupo II del presente estudio, se observó un mayor nivel de la lipoperoxidación, un menor nivel GSH y además un diagnóstico histológico de inflamación cerebral, necrosis neuronal y cerebelitis severa.

Los resultados obtenidos en el grupo II está relacionado probablemente al aumento del estrés oxidativo, expresados en aumento de radicales libres.  
(43) El etanol por sus propiedades físicas se puede difundir de manera fácil a través de la membrana celular, este influye en la acción de las fibras nerviosas interfiriendo con infiltración de iones como potasio y sodio, a su vez atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), distribuyéndose a todos los fluidos y tejidos corporales. (66) El etanol atraviesa casi al 100% la BHE (90%), por esta razón afecta directamente al sistema nervioso central; su ingesta elevada está implicada en varios factores químicos y genéticos a nivel neuronal. (67,69)

El metabolismo del etanol se produce en un 85 a 95% a nivel hepático, la principal vía es por la acción secuencial de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) que convierte el etanol en acetaldehído y por acción de otra enzima, la aldehído deshidrogenasa (ALDH), se produce acetato.  
(67,69) Existen dos vías más de metabolización de menor proporción; el sistema de oxidación microsomal (MEOS) (P-450) isoenzima 2E1, y la vía catalasa. (66,69) A nivel del SNC la ADH clase III es la principal isoforma, pero presenta baja afinidad e incluso en situaciones de ingesta alta de alcohol.  
(67,69,70) Se ha observado a nivel cerebral la presencia de citocromos del sistema MEOS CYP450 2E1, (69) y el sistema Catalasa, se encuentran en el endotelio microvascular del cerebro generando productos oxidativos y nitrosativos causantes del daño oxidativo en la BHE y las neuronas, (69) esto puede explicar la disminución del GSH y el aumento de la lipoperoxidación



observados en el grupo II, resultados similares observó de Almansa <sup>(68)</sup> administrando etanol al 5% (v/v) en ratas por 6 semanas.

Las evidencias demuestran que tanto la ingesta aguda como crónica de etanol dan lugar a proceso de neurodegeneración y nivel neuroinflamatorios en el tejido cerebral. <sup>(69)</sup> La neuroinflamación se produce por un mecanismo de defensa de las células inmunitarias para la eliminación de cuerpos extraños asociándose a una activación de células gliales y linfocitos. En los microvasos del cerebro el daño del tejido es causado por los radicales libres, expresado en estrés oxidativo; siendo las neuronas susceptibles porque los niveles de antioxidantes exógenos y endógenos no son numerosos. Las células inmunes se infiltran en el tejido cerebral debido a la lesión, causando mediadores pro y antiinflamatorios, sumando el daño oxidativo, conllevando a la neuroinflamación. <sup>(69)</sup> En el proceso inflamatorio las neuronas secretan citoquinas y productos oxidativos, similar característica en enfermedades neurológicas como Alzheimer y Parkinson. <sup>(70)</sup>

A nivel morfológico, estudios realizados en pacientes alcohólicos reportan apoptosis y disminución de las células piramidales del hipocampo; células de Purkinje del cerebelo y en particular de la sustancia blanca. Conllevando a un aumento de células gliales de la corteza frontal superior, como causa de neurodegeneración y proliferación de astrocitos, como fenómeno de reparación. <sup>(67)</sup>

Las células gliales intervienen en forma prioritaria en la respuesta inmunitaria innata y son la principal fuente de proliferación de los factores proinflamatorios en el cerebro, tales como citoquinas; interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 12 (IL-12), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y también sintetizan y liberan factores citotóxicos de corta vida media como son los radicales superóxido ( $O_2^-$ ), el óxido nítrico

(NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), constituyendo la causa del fenómeno neuroinflamatorio. <sup>(65)</sup>

El hipocampo, encargada de la memoria a corto plazo y la memoria espacial, es una de las regiones más sensibles a la injuria del etanol; estudios en neuroimagen han evidenciado una disminución de la dimensión del hipocampo en pacientes con alcoholismo, y en animales se ha observado una reducción en el volumen de la capa granular del giro dentado (GD) del hipocampo. Estos estudios documentan una reducción de sustancia blanca como gris en la zona cortical y aumento del volumen de los ventrículos en personas alcohólicas crónicos. <sup>(68)</sup> Lo mencionado guarda relación con nuestros resultados observados en el grupo II a nivel histológico, donde se aprecia resultados similares en el cerebro de ratas.

Los enfoques terapéuticos basados en potentes antioxidantes naturales que crucen la barrera hematoencefálica, serían la clave para prevenir el daño cerebral, contribuyendo a mejorar la calidad de vida en personas con neurodegeneración. <sup>(65)</sup>

En cuanto al grupo III del presente estudio que se le administró cáscara deshidratada de uva borgoña, se observó un aumento significativo del GSH, una disminución de la lipoperoxidación y además un diagnóstico histológico con menor incidencia de inflamación cerebral, necrosis neuronal y cerebelitis severa, estos resultados pueden tener relación con la composición fitoquímica de la muestra.

Con respecto a la composición fitoquímica de la cáscara de *Vitis vinífera*, citado en líneas anteriores, reportan que es una importante fuente de compuestos fenólicos, como flavonoles y antocianinas, este último se puede ubicar en la cáscara de la uva borgoña, siendo responsable del color rojo oscuro de este fruto. En la cáscara de las uvas tintas se han identificado tres monoglucósidos como la quercetina, kaempferol y miricetina, los

compuestos fenólicos no coloreados más abundantes en piel son los flavan-3- como la catequina y epicatequina. <sup>(72)</sup>

La uva posee un colorante llamado antocianinas, las más comunes son: cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina, que por lo general se presentan como glicósidos y acilglicósidos; siendo el más abundante la malvidina-3-O-glucósido. Otros compuestos fenólicos presentes en la cáscara de Uva Tinta pertenecientes al grupo de los estilbenos son la fitoalexina, resveratrol y viniferinas, que cumplen un rol antimicrobiano. La mayoría de sustancias beneficiosas se encuentran la cáscara de uva, por ello cumplen un papel importante en la salud. <sup>(72, 73 y 42)</sup>

Molina (2010) reportó que los compuestos fenólicos de mayor abundancia en la cáscara de uva son el ácido gálico, rutósido (glucósido de quercetina) y resveratrol. En dicha investigación indica que el total de fenoles es de  $10,60 \pm 0,40$  mg EAG/g peso seco, presentando una importante capacidad antioxidante de uva, donde podría proveer en 200g más de 170 mg de compuestos fenólicos. <sup>(81)</sup>

La quercetina es uno de los flavonoles más abundante en la uva <sup>(74)</sup>, posee una estructura química que le confiere propiedad antioxidante, neutraliza radicales libres como aniones superóxido, óxido nítrico y peroxinitritos entre otros. Este efecto antioxidantes también podría deberse a la inhibición de la enzimas xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, impidiendo la apoptosis celular, incrementando a su vez la producción de antioxidantes endógenos, atribuyendo propiedades neuroprotectoras. <sup>(75)</sup> Últimos estudios *in vivo* realizado en animales de experimentación han dado evidencia que la quercetina actúa en el cerebro protegiendo a las neuronas llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que la quercetina ejerce un efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo inducido por procesos de isquemia/reperfusión. La Quercetina también aporta una barrera de protección contra la lipoperoxidación producida en el cerebro por

insuficiencia de vitamina E, y atenúa la toxicidad neuronal en resultado por la inducción de etanol. <sup>(76)</sup> Todo esto podría explicar el menor nivel de lipoperoxidación en el grupo III.

Khalaf reportó que administrando extracto de *Camellia sinensis* (Té verde), que posee alto contenido en catequina, en ratas inducidas a neurotoxicidad, logró disminuir el estrés oxidativo, aumentando la concentración de la GSH. <sup>(80)</sup>

Las catequinas al igual que la quercetina es un flavonoide que presenta una mayor actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante está relacionada con su estructura química, la quercetina tiene un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en la posición 3 del anillo C, en cambio la catequina tiene un grupo -OH en la posición 3 del anillo C, esta estructura es beneficiosa porque ha demostrado acción antioxidante ya que inhiben los radicales libres como Hidroxilo y Superóxido, estos son los principales causantes de la lipoperoxidación. En un estudio de cultivos de células nerviosas mostraron que el uso de quercetina, catequina y la galato de epigallocatequina (EGCG) inhibe la respuesta inflamatoria, bloqueando el óxido nítrico sintasa (iNOS) y la expresión de la ciclooxigenasa -2 (COX-2), así como la creación de óxido nítrico (NO), la liberación de citocinas pro-inflamatorias, y la generación de radicales libres, en los astrocitos y la microglia. <sup>(77)</sup> Además en estudios *in vivo* demuestran que el tratamiento de catequinas en ratas jóvenes, disminuyó la concentración de oxidantes en plasma, así como ROS en el hipocampo. <sup>(78)</sup>

El resveratrol también presente en la cáscara de uva, es un flavonoide que se encuentra en la naturaleza, estudios demuestra que este antioxidante inhibe el factor nuclear kB (NFkB), involucrado en toxicidad de las placas  $\beta$ -amiloide que se relaciona con las enfermedad neurodegenerativas, una de ellas el Alzheimer. <sup>(79)</sup> Zhenhua (2018) demostró que la administración de

resveratrol disminuyó las deficiencias cognitivas en ratas, recuperando la memoria espacial y de referencia; además redujo la producción de ROS y apoptosis, comprobando los efectos beneficiosos de este compuesto fenólico. <sup>(82)</sup> Una de las principales fuentes de resveratrol es la cáscara de uva y el vino tinto, diversos estudios han correlacionado menos incidentes cerebrovasculares y cardiovasculares por el consumo de este flavonoide. Otra característica muy importante del resveratrol es su capacidad de cruzar la barrera Hematoencefálica. <sup>(83)</sup>

La evidencia científica ha corroborado que el trans resveratrol elimina radicales libres como los derivados de la peroxidación lipídica, radicales de carbono y ROS protegiendo las neuronas. <sup>(84)</sup> Este efecto antioxidante del resveratrol puede ser debido, en parte, a su capacidad de inducir la expresión de enzimas antioxidantes como MnSOD Y glutatión peroxidasa en roedores, <sup>(85)</sup> por otro lado induce al Coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1-alfa (PGC1 $\alpha$ ), principal regulador de la biogénesis mitocondrial, y del estrés oxidativo. <sup>(86)</sup> Wu (2013) demostró que el resveratrol influye en la expresión y translocación nuclear de FOXO3 en células dopaminérgicas, siendo los genes FOXO la primera línea de neuroprotección de los radicales libres. <sup>(87)</sup>

Sandoval (2008) demostró el efecto hepatoprotector de la cáscara y semilla de la *Vitis vinífera* en ratas con agresión alcohólica, donde se observaron una disminución en los marcadores de estrés oxidativo, <sup>(42)</sup> Muñoz (2005) determinó el efecto protector de la *Vitis vinífera* contra el estrés oxidativo producido por electrolisis sobre anillos aórticos de rata, obteniendo resultados favorables. <sup>(88)</sup>

Estos efectos presentados en otros estudios sobre los componentes fitoquímico de la cáscara de uva sugirieron tener relación con lo evidenciado en nuestro estudio.

## **VI. CONCLUSIONES**

La administración de la cáscara deshidrata de *Vitis vinífera* dosis 1000 mg/kg, produjo una disminución significativa de los niveles de GSH, en el tejido cerebral y promovió una disminución de la lipoperoxidación.

La administración de la cáscara deshidrata de *Vitis vinífera* dosis 1000 mg/kg, protegió la morfología del tejido cerebral en ratas inducidas a toxicidad por administración de etanol.

De los observado en el presente estudio de investigación se infiere que la administración de la cáscara deshidrata de *Vitis vinífera* ejerce un efecto neuroprotector sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a toxicidad por administración de etanol.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Realizar pruebas de capacidad antioxidante *in vitro* de la cáscara de *Vitis vinífera* de las distintas variedades.

Utilizar además de cáscara, la semilla de uva para medir el efecto neuroprotector porque estudios refieren capacidad antioxidante.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centro de Investigación de enfermedades neurológicas. Enfermedades Neurodegenerativas, investigación e innovación. [internet]. Madrid: Fundación CIEN; [citado el 16 de julio de 2013] Disponible en: <http://fundacioncien.es>
2. Luis Bernardo Tovar y Romo. La muerte de las neuronas y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. 2010; 2(2):7-8
3. World Health Organization. The global burden of disease: 2008 update. Suppl: 19-20, 24.
4. Rodríguez del Álamo y Catalán. Enfermedad del Alzheimer y enfermedad de Parkinson: Comparaciones clínicas entre las dos enfermedades neurodegenerativas más frecuentes en los ancianos. Rev Española Neurológica. 2005; 6(2)
5. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet. 2005, 21(9):21-7
6. Scheltens P. Moving forward with nutrition in Alzheimer's disease. Eur J Neurol. 2009; Suppl 1:19-22
7. Morris MC. The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. Eur J Neurol. 2009, Supl 1: 1-7
8. Reina García Closas. Nutrición y enfermedad de Alzheimer. Real Invest Demenc 2010; 46: 24-36
9. Martín Fidel Romano, Maria Daniela Nissen, Noelia Maria Del Huerto Paredes. Enfermedad de Alzheimer. Med Unne, 2007 (12).
10. Behl C, Moosmann B. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol. Chem.* 2002, 383:521-536.
11. Youdim KA, Spencer JPE, Schroeter H. Rice-Evans C. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem.* 2002, 383:503-519.
12. Gordon MH. Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat Prod.* 2002, Rep. 13: 265- 273.
13. Sara Martín, Pilar Gomez-Serranillos, Emilia Carretero, Victoria Naval, Teresa Ortega, Angel M. Villar. Estudios de la actividad neuroprotectora de vinos

- jóvenes monovarietales de la comunidad de Madrid. Rev Fitoterapia 2006; 6(2): 167-169.
14. García Alonso J. Periago M. J. Vidal Guevara M. L. y Cantos E. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. An Vet 2002, 18: 103-114.
  15. Alfredo Gutiérrez Maydata. VINO, POLIFENOLES Y PROTECCIÓN A LA SALUD Revista Cubana Aliment Nutr 2002; 16(2):134-41.
  16. Jon Toledo Atucha. Epidemiología descriptiva y analítica de la enfermedad de Alzheimer. Real Invest Demenc. 2011; 47: 16-23.
  17. Carolina Ruiz Romero y Isabel Rubio. Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice. Brain Research. 2009; 1281, Pp: 91-100
  18. MINSA. Epidemiología del Alzheimer en el Perú [internet]. Perú [citado el 8 de noviembre del 2013]; Disponible en: <http://www.icn.minsa.gob.pe>
  19. De Lau, L. M. & Breteler, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2006; 5(6): 525-35.
  20. Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., Marshall, F. J., Ravina, B. M., Schifitto, G., Siderowf, A. & Tanner, C. M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. Neurology. 2007, 68(5): 384-386
  21. Zhang, Z. X. & Roman, G. C. Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. Neuroepidemiology. 1993; 12: 195-208.
  22. Neus Fábregas y Ricard Valero. Fisiología cerebral y monitorización neurológica y de la profundidad anestésica. Fac Med Barcelona. 2001, 27(1): 49-55.
  23. Francisco Guzman. Fisiopatología del trauma craneoencefálico. 2008, 39(3).
  24. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Editorial El Sevier; 12° ed. 2013, Pp: 324-336
  25. Vicente Beltrán Campos. Euridíce Padilla Gomez, Lourdes Palma, Azucena Aguilar, Sofía Díaz. Bases neurobiológicas del envejecimiento neuronal. Rev Digital UNAM. 2011; 12(3).
  26. Zorrilla GA. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev Cubana Invest Biomed. 2002. 21: 178-85



27. José María Segovia de Arana. Enfermedades neurodegenerativas por proteopatías. 1º ed. Madrid 2001. Pp: 123-136
28. Pilar Sanz Cartagena. Papel neuroprotector de la memantina en la enfermedad de Alzheimer. Rev Alzheimer. 2006; 34(2)
29. Margarita Gómez-Chavari, G. Roldan-Roldan, R. Morales-Espinosa, G. Pérez-Soto, C. Torner-Aguilar. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. Arch Neurocién. 2012; 17(1): 25-33.
30. Leighton F, Urquiaga I. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. 2000; 7(7): 5-13
31. Valls J, Lampreave M, Nadal M, Arola L. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili. 2000.
32. Leighton F, Urquiaga I, Diez M. Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes. 77ª Asamblea General de la OIV y XXII Congreso de la Vid y del Vino. Buenos Aires, Argentina. 1997.
33. Jano P, Magnere V. Efectos del riego deficitario en la calidad de mostos y vinos en variedades viníferas finas. [Tesis] Pontificia Universidad Católica de Chile. 2003.
34. Taylor, A. Cataract: relationship between nutrition and oxidation. .J. Am. Coll. Nut. 1993.
35. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev. 1998; 56: 317-333.
36. Lambert, J. D., Sang, S., Yang, C. S. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. Chem. Res Toxicol. 2007; 20(1): 583-585.
37. Teresa Santos Bobillo, Teresa Alonso Beato, Ignacio Ladero. Santos & Asunción Martín Rodríguez. Importancia de la tierra en el cultivo de la *Vitis Vinífera*. Fac Farmacia Univ Salamanca. 2008. España.
38. García Alonso J.1, Periago M J.1, Vidal Guevara M L.2 y Cantos E. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES EN CONCENTRADOS DE UVA Y FRUTAS ROJAS. An. Vet. 2002. 18(3): 103-112.

39. Ferreira R. Importancia del vino como antioxidante en la prevención de daño oxidativo. [monografía en Internet]. Antioxidantes Vitaminas y Nutrientes [revista en Internet]. 2002;(2) [citado el 10 de agosto de 2008]. Disponible en: <http://www.antioxidantes.com.ar/Home2.htm>
40. Stewart JR, Artime MC, O'Brian CA. Resveratrol: A candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. J Nutr. 2003; 133(7).
41. Zhou HB, Chen JJ, Wang WY, Cai JT, Du Q. Actividad anticáncer del resveratrol en la células gástricas primarias humanas implantadas de carcinoma en ratones desnudos. Mundo J Gastroenterol. 2005; 11(2): 280-4.
42. Miguel Sandoval, Karen Lazarte, Inés Arnao. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitisvinifera* L. (uva). An Fac Med 2008, 69(4).
43. Wathita Phachonpai, Jintanaporn Wattanathron, et al. *Coscinium Fenestratum* protects against ethanol induced neurodegeneration in adult rat brain. Am J Pharmacol. Toxicol 2012; 7(7): 81-88.
44. Teresa Santos Bobillo, Teresa Alonso Beato, Ignacio Ladero. Santos & Asunción Martín Rodríguez. Importancia de la tierra en el cultivo de la *Vitis Vinífera*. 2008. Fac Farmacia Univ Salamanca. 2008. España.
45. SENA. Manejo pos cosecha y comercialización de la uva. 2001, 6(7): 36-40
46. Francisco Estrada Rojo, Julio Morales Gómez, Erika Tabla Ramóna, Barbara Solís Luna, Hilda Alejandra Navarro Argüellesa, Marina Martínez Vargas, et al. Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. Revista de la facultad de medicina de la UNAM. 2012, 55(4).
47. Witte y Badda. Self-stimulation and alcohol administered orally or intraperitoneally. Exp Neurol. 1983, 82: 675-682.
48. Boyne A, Ellman G. Assay for glutathione. Anal Biochem. 1972; 62(2): 84-92.
49. Buege y Aust. Determination of tissue lipid peroxidati. 1978; 49(3): 247-259.
50. Suarez CS. Detoxificación y defensa antioxidante por defectos de xenobióticos alimentarios. [Tesis de maestría]. Fac Med UNMSM. 1995
51. FESSACAL. Manual de Recomendaciones para el cuidado y manejo de animales de laboratorio. 3era edición. 2014.
52. Argimón Josep, Jiménez Josep. Métodos de investigación y epidemiología. 2004. Tercera edición. Elsevier.

53. Hong I-S, Lee H-Y, Kim H-P. Anti-Oxidative Effects of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) on Immobilization-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. PLoS ONE. 2014. Volume 9.
54. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. The Journal of Nutrition. 2003; 133 Suppl.
55. Poli Giuseppe, Cadenas Enrique, Packer Lester. Marcel Dekker. Free Radicals in Brain Pathophysiology. Inc. New York USA. 555 pags. 2000.
56. Hyeong-Geug Kim, Jin-Seok Lee, Min-Kyung Choi, Jong-Min Han, Chang-Gue Son. Ethanolic Extract of *Astragali Radix* and *Salviae Radix* Prohibits Oxidative Brain Injury by Psycho-Emotional Stress in Whisker Removal Rat Model. PLOS One. May 2014. Volume 9. Issue 5.
57. McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. Annu Rev Nutr. 2005. 25: 261-295.
58. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. Eur J Biochem 2000. 267: 4912–4916.
59. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. ProgNeurobiol. 2000. 62: 649–671.
60. Neuroprotección, Excitotoxicidad, El estrés oxidativo, Otros tratamientos neuroprotectores Disponible en: [http://centrodeartigo.com/articulosenciclopedicos/article\\_81640.html](http://centrodeartigo.com/articulosenciclopedicos/article_81640.html).
61. Analytical Methods for Resolving Data From TBA2-MDA Reaction Mixtures. Disponible en: <https://www.nwlifescience.com/products/assaykit/tba-mdanalysis.htm>.
62. Ley Peruana Nro. 27265 de la protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. 2010 March 2 [fecha de acceso 1 de abril de 2010]; disponible en: <http://www.congreso.gob.pe/ntley/Imagenes/Leyes/27265.pdf>.
63. Elsa M. RodriguezPerez, et al. Actividad Antioxidante de los Polifenoles de *HypogymniaTavaressi*. Quim. Nova, Vol. 39(4), 456-461. 2016.

64. Franciso Erick Gonzales – Jimenéz, et al. Empleo de Antioxidantes en el Empleo de diversas enfermedades Crónico Degenerativas. Revista Especializada de Ciencias de la Salud, 18 (1): 16-21, 2015.
65. Morales Inelia, Arata Loredana y Maccioni Ricardo. La Teoria de la neuroinmunomodulación en enfermedades neurodegenerativas: nuevas evidencias científicas. Revista Chilena de Neuropsiquiatría, vol. 53, N° 1. 2015, pp. 53-58. Chile.
66. Jairo Tellez Mosquera. Alcohol Etílico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. RevFacMedUnivNacColomb 2006 Vol. 54 No. 1.
67. Shlesinger Piedrahita, et al. Neurotoxicidad Alcohólica. Colombia. Revista 25(1): 2017.
68. Inmaculada Almansas Frías. Efecto del consumo crónico de etanol sobre el cerebro en rata. Tratamiento con Naltrexona. Tesis Doctoral. Universidad CEU. Valencia. 2011.
69. Francesca Porcu. Efecto del consumo intensivo y repetido de etanol sobre la integridad de la barrera hematoencefálica. Implicación de los receptores toll – like 4 (TLR4). Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2017.
70. Aragon, et al. Alcohol y Metabolismo Humano. Universitat Jaume. Vol 14. 2001.
71. Laura Clementina Gonzáles Torres, Juan Armendáriz Borunda. Aspectos Inmunológicos en la enfermedad de Parkinson. ArchNeurocien Vol. 10, N°3: 168-169, 2005.
72. María Zuñiga Morales. Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. 2005. Chile
73. Maria La Torre Leal. Polifenoles de la Uva. España. 2016
74. Ana María Muñoz Jauregui, et al. Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. Rev Soc Quím Perú. 2007, 73, N° 1 (30-40).
75. Vicente Vicente, Prieto Morales. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. Revista Toxicologica, vol 30. 2012. España.

76. Jose Sanchez Gallego. Tesis Doctoral: Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol. 2009. Universidad de Salamanca.
77. Daniel Limon, et al. Los Flavonoides: Mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. 2010.
78. Laura Ruiz Guerra. Efecto de los antioxidantes en la prevención del envejecimiento celular. Universidad de Les Illes Balears.
79. Andrea Masias Borge, et al. El Resveratrol y sus posibles usos como nueva terapia farmacológica. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX. 2013.
80. AA Khalf, Walaa A. Moselhy y Marwa I. A The protective effect of green tea extract on lead induced oxidative and DNA damage on rat brain. NeuroToxicology 33 (2012) 280–289.
81. D. M.A. Molina-Quijada, et al. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. Vol. 8, No. 1, May 2010, 57–63.
82. Zhenhua Shi, et al. Resveratrol Attenuates Cognitive Deficits of Traumatic Brain Injury by Activating p38 Signaling in the Brain. 2018; 24: 1097-1103.
83. David Porquet Costa. Efecto del Resveratrol en modelos Murinos de envejecimiento y enfermedad de Alzheimer. TESIS DOCTORAL. Universidad de Barcelona. 2014.
84. Cristofol R. et al. Neurons from senescence - accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol. Journal of Pineal Research. 2012. 52(3) 271 – 81.
85. Liu G, et al. Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence – accelerated mice. Life Sciences. 2012. 91 (17-18), 822 -7.
86. Mudo G Makel, et al. Transgenic expression and activation of PGC - 1 $\alpha$  protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. 2012. Cellular and molecular life Sciences: CMLS, 69(7).

87. Wu P, et al. Resveratrol preconditioning increases methionine sulfoxide reductases A expression and enhances resistance of human neuroblastoma cells to neurotoxins. 2013. The journal of nutritional biochemistry. 24 (6), 1070 -7.
88. Isabel Margarita Muñoz. Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de Vitis vinífera en aortas de ratas sometidas a estrés oxidativo. TESIS. Universidad de Chile. 2005